

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-159580

(P2007-159580A)

(43) 公開日 平成19年6月28日(2007.6.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47	4 B O 6 3
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 4
審査請求 有 請求項の数 15 O L (全 24 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2006-330466 (P2006-330466)
 (22) 出願日 平成18年12月7日 (2006.12.7)
 (62) 分割の表示 特願平5-518620の分割
 原出願日 平成5年4月14日 (1993.4.14)
 (31) 優先権主張番号 870,029
 (32) 優先日 平成4年4月17日 (1992.4.17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 503235972
 ダナーファーバー キャンサー インステ
 テュート インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 O 2 1 1 5 マサチュー
 セッツ州 ボストン ビネイ ストリート
 4 4
 (74) 代理人 100062225
 弁理士 秋元 輝雄
 (72) 発明者 テダー, トーマス, エフ.
 アメリカ合衆国 O 2 7 6 0 マサチュー
 セッツ州 サウス ナティック ファイブ
 インディアン リッジ ウェイ (番地
 無し)

最終頁に続く

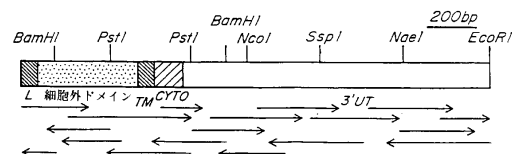
(54) 【発明の名称】 リンパ球活性化抗原HB 1 5 : 免疫グロブリン上科の一種

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 活性化リンパ球によって発現される新規な細胞表面糖蛋白 (HB 1 5 と称する) を提供する。

【解決手段】 リンパ球活性化抗原HB 1 5、並びにHB 1 5 をコードするヒト c DNA および遺伝子配列が開示される。HB 1 5 は検出可能なレベルでは循環白血球によって発現されないが、組織間では固有の発現パターンを有する。HB 1 5 は皮膚のランゲルハンス細胞および他の樹状突起細胞(dendritic cells)の亜集団によって専ら発現される。さらにまた、HB 1 5 と反応する抗体、および抗HB 1 5 抗体またはHB 1 5 機能に対する他の拮抗物質を免疫疾患、疾病または症候群の治療に用いる方法が開示される。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号：2 で表される H B 1 5 蛋白の細胞外ドメイン、膜貫通 (transmembrain) ドメインまたは細胞質ドメインをコードする配列からなる分離核酸。

【請求項 2】

配列番号：2 に示した全 H B 1 5 配列をコードする配列を含む、請求項 1 の核酸。

【請求項 3】

配列番号：2 で表される H B 1 5 人蛋白の哺乳類相同体をコードする配列からなる分離核酸であって、当該相同体をコードする当該配列が配列番号：1 で示されるコーディング配列からなる D N A プローブとストリンジェントなハイブリッド形成条件下でハイブリダイズすることができ、そしてさらに当該相同体が配列番号：2 で表される人蛋白 H B 1 5 で観察される組織分布を有する分離核酸。

10

【請求項 4】

当該相同物の細胞外ドメイン、膜貫通ドメインまたは細胞質ドメインをコードする請求項 3 の核酸の部分からなる分離核酸。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれかの核酸からなる組換えベクター。

【請求項 6】

請求項 5 のベクターでトランスフェクションされた培養細胞。

【請求項 7】

H B 1 5 蛋白の産生を可能とする条件下で請求項 6 の培養細胞を培養し、そして細胞培養から H B 1 5 蛋白を回収することからなる配列番号：2 で表される人 H B 1 5 蛋白お製造方法。

20

【請求項 8】

20 ヌクレオチドよりも大きい分離核酸プローブであって、当該プローブはストリンジェントなハイブリッド形成条件下で配列番号：1 のヌクレオチド配列のコーディング部分とハイブリダイズすることができるプローブ。

【請求項 9】

ストリンジェントなハイブリッド形成条件下に配列番号：2 で表される H B 1 5 蛋白をコードする配列番号：1 で与えられる核酸配列と相補的な配列を有する核酸とハイブリッドすることが可能である、長さが 20 ヌクレオチドよりも長いポリヌクレオチド。

30

【請求項 10】

請求項 9 のポリヌクレオチドからなる組換えベクター。

【請求項 11】

請求項 10 のベクターでトランスフェクションされた培養細胞。

【請求項 12】

当該ポリペプチドの産生を有効にする条件下請求項 11 の細胞を培養し、そして細胞培養から当該ポリペプチドを回収することからなる、請求項 9 記載のポリヌクレオチドでコードされたポリペプチドを製造する方法。

【請求項 13】

請求項 1, 2, 3, 4 または 9 のいずれかの核酸によりコードされるポリペプチド。

40

【請求項 14】

請求項 13 のポリペプチドのアミノ酸配列を有するポリペプチド。

【請求項 15】

配列番号：2 で開示される H B 1 5 蛋白アミノ酸配列の部分の配列を有する免疫原性ポリペプチドを特異的に認識する抗体。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】****発明の分野**

50

本発明は、ヒトリンパ球活性化抗原をコードする核酸配列、特にリンパ球活性化抗原 H B 1 5 をコードする配列およびこれらの配列によってコードされる蛋白およびポリペプチドに関する。

【 0 0 0 2 】

本発明の基となった研究の一部は合衆国政府の基金によって行われた。したがって合衆国政府は本発明について一定の権利を有する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 3 】

発明の背景

免疫応答を調節する多くの細胞表面分子は、免疫グロブリン (I g) で見出される保存構造の特徴と類似するものを含む。これらの分子は、共通の前駆体から進化したように思われ、したがって大きな上科 (スーパーファミリー) のメンバーである遺伝子によってコードされる (Williams ら、Annu . Rev . Immunol . 88:381-405(1988))。I g 上科の仲間の多くは、細胞 - 細胞粘着およびシグナル誘発に関与する。この種類の殆どのものが多数の直線的に集合した I g 様のドメインを含むが、一方、いくつかの蛋白は単一の I g 様ドメインを含むことが認識された。細胞 - 細胞粘着に関与することが分かっている、または推定される単一の I g 様ドメイン蛋白は、C D 8 α (Littman ら、Cell 40:237(1985))、C D 8 β (Johnson ら、Nature 323:74(1986))、C D 7 (Aruffo ら、EMBO J. 6:3313(1987))、T h y - 1 (Williams ら、Science 216:696(1982))、C D 2 8 (Aruffo ら、Proc . Natl . Acad . Sci . , USA 84:8573(1987))、C T L A - 4 (Brunet ら、Nature 328:267(1987))および末梢ミエリン鞘の構造蛋白である P o (Lemke ら、Cell 40:501(1985))を含む。さらに、他のものは多分子集合シグナル誘発複合体を形成する B および T リンパ球の抗原受容体 (レセプター) と関係するが、これらは、C D 3 γ 、 δ および ϵ 鎖 (Gold ら、Nature 321:431-434(1986); van den Elsen ら、Nature 312:413-418(1984))、B 2 9 (Hermanson ら、Proc . Natl . Acad . Sci . , USA 85:6890(1988))および m B 1 (Sakaguchi ら、EMBO J. 7:3457-3464(1988))を含む。

【 0 0 0 4 】

リンパ球に見出される蛋白を含む 2 種の I g 様ドメインは専ら細胞の活性化に関係し、細胞 - 細胞相互反応の仲介に関与することが分かっている。C D 2 8 は非活性化 T および B リンパ球よりも活性化されたそれらでより多く発現され (Turka ら、J . Immunol . 144:1646(1990))、C T L A - 4 は、全てではないにしても殆ど活性化 T および B リンパ球によって発現される (Brunet ら、Nature 328:267(1987); Harper ら、J . Immunol . 147:1037-1044(1991))。活性化 B 細胞によって発現される B 7 分子のための T 細胞レセプターとしての C D 2 8 の役割は、C T L A - 4 と同様 (Linsley ら、J . Exp . Med . , 174:561-569(1991))であることが最近確認された (Linsley ら、Proc . Natl . Acad . Sci . , USA 87:5031-5033(1990); Freeman ら、J . Immunol . 143:2714-2722(1989))。C D 2 8 および B 7 同様、殆どの I g 様ドメイン含有レセプターは他の細胞上に存在する I g 上科の他の種類と相互に作用する。

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 5 】

ヒトリンパ球ライブラリーからクローニングされた c D N A を分析し、活性化リンパ球によって発現される新規な細胞表面糖蛋白 (H B 1 5 と称する) をコードすることを示す。c D N A によってコードされる成熟 1 8 6 アミノ酸蛋白は、単一の細胞外 V 型免疫グロブリン (I g) 様ドメイン、膜貫通 (トランスメンブレン) ドメインおよび 3 9 アミノ酸細胞質ドメインを含んでいた。ノザンプロット分析によって、H B 1 5 は、類リンパ芽球細胞株によって発現される ~ 1 . 7、2 . 0 および 2 . 5 k b の 3 種の m R N A 転写物に由来することが明らかにされた。H B 1 5 と反応するモノクローナル抗体 (単クローン性抗体) を製造し、H B 1 5 が単一鎖の M r 4 5 0 0 0 の細胞表面糖蛋白として発現されることを示すために用いた。H B 1 5 発現は、類リンパ芽球細胞株および有糸分裂促進剤 (

ミトゲン) 活性化リンパ球に特異的であった。H B 1 5 は循環白血球では検出可能な程度には発現されなかった。免疫組織学的な分析によって、H B 1 5 は組織間で固有の発現パターンを有することが明らかにされたが、発現は専ら造血組織で見出され、小胞間細胞 (ininterfollicular cells) では分散的に、さらに被膜帯 (mantle zone) および胚中心細胞では弱く発現される。特有なことには、H B 1 5 はまた皮膚内のランゲルハン氏細胞 (Langerhan's cells) および循環樹状突起細胞 (dendritic cells) によっても発現される。したがって、H B 1 5 糖蛋白は I g 上科の新種の典型である。

【 0 0 0 6 】

H B 1 5 蛋白またはその部分 (その特異的なドメイン、リガンド結合フラグメントもしくは免疫特異的フラグメントの何れかを含む) をコードする c D N A 配列を複製可能な発現ベクターに組み込み、適切な宿主 (例えば細菌、酵母、または真核細胞培養) をこのベクターで核酸感染 (トランスフェクト) させることができる。また別に、H B 1 5 蛋白またはその部分をコードするゲノム D N A フラグメントをその場で (*in situ*) 利用することができる。発現蛋白もしくはポリペプチド、またはその拮抗物質は哺乳類の免疫機能を調節するために用いることができる。また、発現生成物は、H B 1 5 または、その特異的なドメインもしくはそのフラグメントのいずれかを含む部分に対する抗体を産生させるために免疫原として用いることができる。

10

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 7 】

したがって、本発明は、一般にリンパ球活性化抗原 (H B 1 5)、またはその特異的なドメイン、リガンド結合フラグメントもしくは免疫特異的フラグメントのいずれかを含む該蛋白の部分をコードする核酸分離物; コードされた H B 1 5 蛋白または、その特異的なドメイン、リガンド結合フラグメントおよび免疫特異的フラグメントを含む該蛋白の部分; H B 1 5 または H B 1 5 リガンドの存在を検出する方法; H B 1 5 または H B 1 5 リガンド機能に対する拮抗物質を同定または開発する方法; 免疫疾患に罹患している患者の診断または治療方法; H B 1 5 またはそのフラグメントを発現している細胞および H B 1 5 またはそのフラグメントと反応する抗体を同定または分離する方法を特徴とする。

20

【 0 0 0 8 】

また別の特徴は、天然には見出しえない種々のアミノ酸配列もしくは糖付加を有する H B 1 5 誘導体、そのような誘導体をコードする核酸分離物、および厳しい条件下で H B 1 5 遺伝子とハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドプローブである。

30

【 0 0 0 9 】

本明細書で用いられるように、" H B 1 5 に対する拮抗物質 " という用語は、H B 1 5 と相互作用し、さらにその機能と干渉する物質 (例えば H B 1 5 と反応する抗体)、または H B 1 5 と結合するリガンドを含む。" 同定する " という用語は、物質の確認を必要とする他の行為、例えば分離または精製を含むことを意図している。" 分離 " または " 実質的に精製された " という用語は、それが調製されまたは天然に生じた環境から分離されまたは単離された核酸または蛋白配列を指す。そのような核酸または蛋白配列はキメラハイブリッドの形であってもよい。このキメラハイブリッドは本発明の核酸配列または蛋白配列の機能を他の種と結合させるために役立つ。" 免疫特異的フラグメント " という用語は、提示蛋白の決定基に対して特異的な抗体と反応する提示蛋白のフラグメントを指す。

40

【 0 0 1 0 】

H B 1 5 蛋白、免疫特異的もしくはリガンド結合フラグメントまたは、該蛋白の特異的なドメイン、または H B 1 5 機能と干渉する H B 1 5 に対する他の拮抗物質は、免疫反応もしくは細胞相互反応の発生もしくは進行を修飾もしくは抑制するために治療的に、または H B 1 5 を発現している細胞に薬剤、毒素もしくは画像化剤を送達するために用いることができる。H B 1 5 c D N A は、これらの蛋白もしくはペプチドを製造するために; 関連蛋白もしくはポリペプチド (例えば、関連動物種からの同種ポリペプチドおよび同一種からの異種分子) をコードする核酸分子を同定するために; または形質転換細胞もしくは非細胞系のいずれかで同様な機能を有する他の新規なキメラ分子を構築するために用いるこ

50

とができる。さらに、HB15 cDNAは、HB15蛋白の発現を抑制するために逆方向（アンチセンス）オリゴヌクレオチドを合成するために用いることができる。細胞によるHB15の機能、産生またな発現の検定は、選択的にHB15蛋白と反応する単クローン性抗体の開発によって可能になる。

本発明の他の特徴および利点は、以下の好ましい実施例の記載および請求の範囲から明らかとなる。

【0011】

図面の簡単な説明

図1は、HB15 cDNAクローンの構造および制限部位の位置を示す。

図2は、HB15のcDNAヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を示す。

図3は、HB15の細胞外ドメインの構造の仮説モデルを示す。

図4Aおよび図4Bは、HB15を発現している3つの類リンパ芽球細胞株で得られた免疫蛍光の結果を示す。

図5A - 図5Fは、HB15発現の免疫組織化学分析を示す。

【発明の効果】

【0012】

HB15蛋白、免疫特異的もしくはリガンド結合フラグメントまたは、該蛋白の特異的ドメイン、またはHB15機能と干渉するHB15に対する他の拮抗物質は、免疫反応もしくは細胞相互反応の発生もしくは進行を修飾もしくは抑制するために治療的に、またはHB15を発現している細胞に薬剤、毒素もしくは画像化剤を送達するために用いることができる。HB15 cDNAは、これらの蛋白もしくはペプチドを製造するために；関連蛋白もしくはポリペプチド（例えば、関連動物種からの同種ポリペプチドおよび同一種からの異種分子）をコードする核酸分子を同定するために；または形質転換細胞もしくは非細胞系のいずれかで同様な機能を有する他の新規なキメラ分子を構築するために用いることができる。さらに、HB15 cDNAは、HB15蛋白の発現を抑制するために逆方向（アンチセンス）オリゴヌクレオチドを合成するために用いることができる。細胞によるHB15の機能、産生またな発現の検定は、選択的にHB15蛋白と反応する単クローン性抗体の開発によって可能になる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

好ましい実施例の説明

リンパ球活性化抗原、HB15は、類リンパ組織および皮膚ランゲルハン氏細胞で専ら発現する。図1を参考にして、多数のcDNAクローンに由来するヌクレオチド配列から推定されるHB15蛋白の構造的特徴は、それがIg上科の新規な種類であることを明瞭に示している。HB15の予測構造は、ただ1個の細胞外Ig様ドメイン、トランスメンブレンドメインおよびほぼ40個のアミノ酸の細胞質ドメインをもつ典型的な膜糖蛋白のそれである。pHB15 cDNAによる細胞株のトランスフェクションで該蛋白の細胞表面発現が生じ、免疫沈降させた蛋白のMrはcDNAトランスフェクト細胞（～45000）とHB15⁺Raji細胞（～40000）の両方で同じであったので、HB15の完全なコード領域が認識された可能性が高い。さらにまた、HB15は単一鎖分子として発現され、しかもその測定Mrがコアー蛋白の予測サイズの2倍であったので、HB15は顕著な翻訳後プロセッシングを受ける可能性が高い。HB15はまたCOS細胞、CHO細胞、マウス前-B細胞株およびヒト赤白血病株を含むcDNAトランスフェクト細胞の表面に発現されたので、表面発現は、TおよびB細胞抗原レセプターに付随するIg様蛋白とともに生じる分子複合体の他の成分の発現に左右されない蓋然性が高い。

【0014】

HB15アミノ酸配列と先に同定された蛋白との比較では、細胞外Ig様ドメインとIg上科の他の種類との類似性を除いて、顕著な同種性は明らかではなかった。HB15 Ig様ドメインは、図2に示すようにドメインのVセットで認められる多くの保存された特徴を含んでいた（Williamsら、Ann. Rev. Immunol. 88:381-405(1988)）。Igドメイン

10

20

30

40

50

の同種性に基づき、H B 1 5 は C y s 1 6 と C y s 8 8 を連結するジスルフィド結合を持っている可能性が高い。したがって、2 個の C y s 残基の間に 7 1 個のアミノ酸が存在し、これは V 関連ドメインにとって適切なサイズであろう (Williams ら、上掲書)。8、8 1 および 1 1 0 位の残基の間にもさらにジスルフィド結合形成の可能性がある。なぜならば、これら C y s は同様に細胞外ドメインに存在するからである。さらに、H B 1 5 は予測される膜上ドメイン内の 1 4 4 位に位置する C y s 残基を有する。C y s 残基はまた、C D 3 δ および C D 7 の同一の位置にも存在するが、このことは幾つかの機能的な重要性、おそらく脂肪質アシル化のための部位としての重要性を提唱する (Kaufman ら、J. Biol. Chem., 259:7230-7238(1984); Rose ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:2050-2054(1984))。H B 1 5 細胞質尾部は C D 7 のそれと大きさが同じであるが (Aruffo ら、EMBO J., 6:3313(1987))、既知蛋白とアミノ酸配列の類似性は共有していない。しかしながら、このドメイン内の 5 個の S e r / T h r 残基は磷酸化の潜在的部位として機能する。したがって、H B 1 5 は、先に報告された構造と明白な関連性を共有しない新規なリンパ球細胞表面抗原であるように思える。

【0015】

H B 1 5 細胞外ドメインは、少なくとも 2 つのエクソンによってコードされるものの典型的な I g 様ドメインとは異なる。部分的なゲノム D N A 配列の分析によって、I g 様ドメインの半分は単一のエクソンによってコードされ、推定膜上ドメインもまた別個のエクソンによってコードされるということが明らかにされた (図 2)。I g 様ドメインが 1 つ以上のエクソンによってコードされえることは、I g 上科のいくつかの種類で認められている。これらには P o 蛋白 (Lemke ら、Neuron, 1:73-83(1988))、C D 4 (Littman ら、Nature, 325:453-455(1987)) および N - C A M (Owens ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:294-298(1987)) が含まれる。この発見は、I g ドメインは複製とその後起こる結合によって進化した原型ハーブドメインから生じたのであろうという構造分析を支持する。しかしながら、上記遺伝子および H B 1 5 遺伝子の各々は、ジスルフィド結合の保存 C y s 残基をコードする配列の間の異なる位置にイントロンを含んでいる (Williams ら、Annu. Rev. Immunol., 88:381-405(1988))。この発見は、イントロンはその後で挿入され、これらドメインの各々の進化のより新しい時点で原型 I g 様ドメインを遮断したのであろうという考えを支持する。

【0016】

H B 1 5 と反応する 2 種の単クローン性抗体は他の殆どの造血細胞上の H B 1 5 を検出することができなかつたので、H B 1 5 の発現は一般にリンパ球に制限されるらしい。殆どの胸腺細胞および循環リンパ球は検出可能な細胞表面 H B 1 5 を発現しないので、H B 1 5 発現はリンパ球発生において後期の事象であるかもしれない。しかしながら、ミトゲンによって活性化された後、末梢リンパ球は、3 日目から 5 日目 (増殖が最大となる期間) に最高レベルの細胞表面 H B 1 5 を発現した。H B 1 5 は、特に培養または活性化後に単球によって低レベルで発現されるかもしれないが、発現のレベルは低く、F c レセプター仲介抗体結合の結果生じるのかもしれない。多くの T および B 細胞株もまた H B 1 5 を発現するが、発現は一般に低レベルである。興味深いことには、細胞株による細胞表面 H B 1 5 発現は、最高増殖期間 (例えば培養に栄養補給が行われた後一日目) に最高になる。これらの結果は、H B 1 5 は類リンパ球の最大増殖のために重要であるか、または細胞の最大増殖はこの抗原の発現に必須であるということを示している。これは、H B 1 5 は造血組織の胚中心細胞によって発現されるという観察と一致している。にもかかわらず、2 2 種類の異なる組織の免疫組織学的な分析によって、H B 1 5 発現は類リンパ球に限定されているように見える。ただ 1 つの例外は、皮膚ランゲルハン氏細胞が H B 1 5 を発現するという発見であった。この制限的発現のユニークな型式は、この蛋白の構造分析と相まって H B 1 5 は新規に同定されたリンパ球活性化抗原であることを示唆する。

【0017】

I g 上科の他の種類との H B 1 5 の構造類似性は、I g 様ドメインは免疫系および神経系でしばしば種々の同型および異型の相互反応に関与するので、H B 1 5 は細胞性反応に

関与するかもしれないことを示唆する。これらの相互反応は、その後の細胞表面下の事象の引き金となる結合機能または粘着を含む。重要な機能的特徴は、通常同種好性または異種好性結合がIg関連分子間で生じるということで、これは向かい合う膜表面の分子間でしばしば生じる。これら他の蛋白に対するHB15の構造的関連性は、活性化後のリンパ球または他のHB15⁺細胞型の同型または異型相互作用のいずれかにおけるこのリンパ球活性化蛋白の役割を示唆しているのかもしれない。

【0018】

図2に開示する特定のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は対応物の代表例で、本発明の開示に従うことによって直接さらに簡便に得られる関連ヒト遺伝子の代表例である。例えば、開示した核酸配列とヒト細胞からの遺伝的物質との厳格な条件下での交差ハイブリダイゼーションは容易に実施でき、同等なヒトの配列をえることができる。同様な態様で、変性オリゴヌクレオチドも開示したアミノ酸配列またはその部分から容易に合成することができ、周知の増幅技術のいずれか、例えばポリメラーゼ・チェーン・リアクションを用いて増幅し、ヒトの同等な配列と結合するプローブを得ることができる。同等な配列によってコードされる蛋白またはポリペプチドが製造できる。開示した蛋白またはペプチドに対する抗体もまた作製でき、同様なエピトープを有するヒトおよび他の哺乳類のペプチドと交差反応させるために用いることができる。このように分離した、開示蛋白またはペプチドのそれと同様な抗体反応性パターンを有するこれらペプチドは、開示した蛋白またはペプチドの同等物であると考えられる。

【0019】

以下の実施例は、本発明の利点を詳述し、さらに、同一物を製造し用いるにつき通常の技術を有する者を補助するために提供される。これらの実施例は本開示の範囲を制限することをあらゆる面において意図するものではない。

【実施例1】

【0020】

HB15 cDNA クローンの分離と性状およびHB15蛋白の性状

B類リンパ芽球細胞株RajiおよびT細胞株H-SB2の標識cDNAを用いて、ヒト扁桃腺cDNAライブラリーを種々のハイブリダイゼーションでスクリーニングした。分離された261個のRAJI⁺H-SB2⁺cDNAクローンのうちの2つ、pB10 (~2.5 kb) およびpB123 (~1.2 kb) は互いにハイブリダイズしたが、既知のB細胞表面抗原をコードするcDNA (Tedderら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:208(1988)) とはハイブリダイズしなかった。このmRNAの発現を、B細胞株 (NALM-6, Namalwa, Daudi, SBおよびRaji)、T細胞株 (Hut-78, H-SB2およびMOLT-3) および赤白血病株 (K562) から分離したポリ(A)⁺RNAを用いたノザンブロット分析によって調べた。pB123 cDNAは、SBおよびRajiの~1.7、~2.0および~2.5 kbの3種類のmRNAと強力にハイブリダイズした。DaudiおよびNamalwa細胞はこのmRNAを低レベルで発現した。さらにこのプロットのオートラジオグラフィ (7日間) によって、NALM-6、Hut-78およびMOLT-3細胞はまたこれら3種のmRNAを発現するがその程度はずっと低く、さらにH-SB2 RNAとの微かなハイブリダイゼーションが検出されるということが明らかにされた。これらの結果は、白血球亜集団内のこの遺伝子の段階的発現を示唆している。

【0021】

これらcDNAについての制限地図を作製し、それらのヌクレオチド配列を求めた。両方のcDNAは重なり合い、最も長い5'配列を有するpB123 cDNAとともに、その5'末端に開放読み枠を含んでいた。いずれのクローンも翻訳開始部位を含まないので、pB10 cDNA挿入物をさらに13個の交差ハイブリダイズcDNAをヒト扁桃腺ライブラリーから分離するために用いた。制限地図とヌクレオチド配列決定によって、このcDNAのうち12個がオーバーラップし、1個のcDNAは最長の5'配列を含んでいた。このクローン (pHB15と呼ぶ) の制限地図およびヌクレオチド配列は図1に示す。完全な長さのcDNAクローンは、EcoRI消化およびサブクローニングによって除去

10

20

30

40

50

される 3' 末端の ~ 500 bp を含む可能性が高い。他の別個の cDNA の 8 クローンは同じ EcoRI 生成フラグメントを有し、EcoRI 部位は、配列決定されたすべての cDNA において同一のヌクレオチド部位に位置していた。

【0022】

pHB15 cDNA は 625 bp の開放読み枠を、非翻訳配列を表す主要な cDNA 部分とともに含んでいた。HB15 の決定ヌクレオチド配列と推定アミノ酸配列は図 2 に示す。成熟蛋白を生成するための予測切断部位は縦矢印で示す。アミノ酸配列の上に示した数字は推定成熟蛋白のアミノ酸残基部位を示し、右側の数字はヌクレオチド部位を示す。アミノ酸は、単一文字コードで表し、* は終了コドンを表す。疎水性特性を有するヌクレオチド表記翻訳領域には下線を施してある。潜在的 N - 結合糖化反応結合部位を示すアミノ酸には下線を施してある。ポリ (A) 付加シグナル配列は波線で示す。Cys 残基は円で囲み、Ig 様ドメインでしばしば保存されるアミノ酸は (+) で示す。ヌクレオチド配列の下矢印は、別の DNA クローンで確認されたエクソン / イントロン境界を示す。

10

【0023】

最初に示された ATG は、提唱されている翻訳開始コンセンサス配列、(A/G)CCAUG と一致するので (Kozak ら、Cell 44:283-292(1986))、おそらく翻訳の開始コドンであろう。異なる mRNA 種は特質的なポリ (A) 付加部位、AATAAA の使用によって生じる可能性が高い。なぜならば、1 つは、3' 非翻訳領域の中央のヌクレオチド 1248 位に見出されたからである (図 2)。このポリ (A) 付加部位は pB123 cDNA で機能を有する。なぜならばそれはポリ (A) テールを伴っていたからである。ポリ (A) 付加部位またはテールは、pHB15 cDNA のおそらく 3' 末端を表している ~ 550 bp EcoRI フラグメントには認められなかった。

20

【0024】

cDNA ライブラリー (長さが ~ 3.0 kb) から分離された、pB123 cDNA とハイブリダイズする 1 クローンは、他の cDNA で認められたものと同一の 229 bp および 107 bp のセグメントを有する固有の配列をもっていた。これらの領域は、エクソン境界を区切るコンセンサス 5' および 3' スプライス配列 (Aebi ら、Trends Genet. 3:102-107(1987)) に対応する隣接配列を有するが、これは、この変種 cDNA はイントロンと 2 つのエクソンを含んでいるということを示している。このクローンによって認識された 3 つのスプライス結合部位は図 2 に示す。

30

【0025】

HB15 蛋白の予測される長さは 205 アミノ酸であった (図 2)。しかしながら、pB123 cDNA はヌクレオチド 500 位でコドン AAG を失っていた。したがって、この蛋白はいくつかの場合においてアミノ酸 1 個分短いであろう。これは、このコドンが潜在的なスプライス部位と接しているので、1 個のコドンを含んだりまたは失ったりすることになる特異的なエクソン / イントロン境界におけるスプライシングにより生じるかもしれない。同様な現象は、Ig 上科の 1 種をコードする CD19 においてもまた認められた (Zhou ら、Immunogenetics, 35:102-111(1992))。カイトらの方法 (Kyte ら、J. Mol. Biol. 157:105-(1982)) によるアミノ酸配列のハイドロパシー分析によって、強い疎水性の 2 つの領域が明らかになった。19 アミノ酸の第一の疎水性部分は、この蛋白のアミノ末端の典型的なシグナルペプチドを表している。フォンヘインのアルゴリズム (von Heijne、Nucleic Acids Res. 14:4683-4690(1986)) によって、もっとも可能性が高い成熟蛋白のアミノ末端は、アミノ酸 19 に続く Thr であろうと予測される。22 アミノ酸の第二の疎水性領域は、おそらくトランスメンブレン領域を表している。3 つの潜在的な N - 結合糖化結合部位 (N - X - S / T) は細胞外ドメインに見出された。したがって、コア蛋白の予測される分子量は ~ 20500 であろう。

40

【0026】

6 個の Cys 残基は HB15 の細胞外ドメインに見出され、1 個は推定膜部分ドメインに認められた。16 位および 88 位のこれらの残基の 1 対は Ig 様ドメインを表している (Williams ら、Annu. Rev. Immunol. 88:381-405(1988))。このドメインは、Ig 様ドメ

50

インのVセットの証明となる特徴的なアミノ酸の多くを含んでいた。蛋白同定源蛋白配列データベース(Protein Identification Resource Protein Sequence Database)を用いた蛋白配列のコンピューター検索によって、いずれの蛋白もIg上科の幾つかの種類以外とはHB15と顕著な配列相同性を共有しないことが示された。

【0027】

Ig重鎖Vドメインのβ型折り畳みシートの提唱配列に基づいて、HB15の細胞外ドメイン構造の仮説モデルが与えられる(参照)。Cys残基は黒丸で表され、異なるエクソンによってコードされるアミノ酸は別々に斜線を施した円で示されている。数字は図2の場合のように予想されるアミノ酸残基位を表している。

【実施例2】

10

【0028】

HB15と反応する単クローン性抗体の製造

NS-1ミエローマ細胞とpHB15cDNAトランスフェクトCOS細胞免疫マウス由来の脾細胞との融合によってハイブリドーマを生成した。HB15mRNA陽性細胞株と間接免疫蛍光分析で反応するが、HB15陰性細胞株とは反応しない単クローン性抗体を分離した。これらの抗体のうち2種、抗HB15a(IgG_{2b})および抗HB15b(IgG₃)はまた、pHB15cDNAをトランスフェクトしたCOS細胞と反応したが、CD19cDNAをトランスフェクトした細胞(Tedderら、J. Immunol. 143:712-717(1989))または発現ベクターのみでトランスフェクトした細胞とは反応しなかった。さらに、これらの抗体はヒト赤白血病細胞株(K562)およびマウス前B細胞株(300.19、pHB15cDNAで安定的にトランスフェクトされている)とは反応した。この抗体は、未トランスフェクト親細胞株、ベクターのみでトランスフェクトした細胞；またはCD19、CD20(Tedderraら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:208(1988))もしくはLAM-1(Tedderら、J. Exp. Med., 170:123-133(1989))cDNAトランスフェクト細胞とは反応しなかった。すべての場合に、抗HB15aおよび抗HB15bの反応性は同一であった。

20

【実施例3】

【0029】

HB15発現の検出

細胞表面HB15の免疫沈降反応 抗HB15a単クローン性抗体を精製しビーズに結合させ、表面をヨウ素化した細胞株の洗剤可溶化抽出物からHB15を免疫沈降させるために用いた。他の細胞株よりHB15の発現レベルが高いので、至適結果は、K562-HB15細胞株(pHB15cDNAをトランスフェクトしたK562細胞)を用いて得られた。抗HB15a単クローン性抗体は、~45000Mr.の単一の広いバンドとして移動する蛋白を特異的に免疫沈降させた。免疫沈降物質を還元または非還元条件下で移動させたとき、同様な結果が得られた。同様な蛋白がRaji細胞株から免疫沈降したが、Mrは~40000であった。したがって、HB15は、細胞表面に非共有結合的に結合した単鎖分子として発現されていた。HB15は活性化リンパ球によって発現された。

30

【0030】

フローサイトメトリー分析を用いて間接免疫蛍光染色でHB15表面抗原の組織分布を調べた。HB15メッセージを発現していなかった2つの細胞株を、レトロウイルスベクターpZi pNeoSV(X)のBamH1部位でサブクローニングしたpHB15cDNAでトランスフェクトした。図4A、Bを参考に、HB15を発現している3つの類リンパ芽球細胞株で得られた免疫蛍光の結果を示す。無地のヒストグラムは細胞のHB15a抗体との反応性を示し、斜線付きのヒストグラムは、非反応性コントロール抗体で得られた免疫蛍光染色のバックグラウンドレベルを示している。調べた33の細胞株の間では、HB15は、B細胞株(Raji、Daudi、Namalwa、Arent、BJAB、SB、Jijoy、AkataおよびSLAを含む)およびT細胞株(Jurkat、H-9、Rex、H-SB2およびHut-78を含む)によって検出可能なレベルで発現していた。しかしながら、HB15発現は一般に低くさらに一定

40

50

ではなかった。最も高い細胞表面発現レベルは、細胞を分割し、したがって最大限に増殖させた場合に得られた。検出可能なレベルのHB15を発現しなかった細胞株は、K562；B細胞株(NALM-6およびRamos)；T細胞株(MOLT-3、RPM18405、PEER、MOLT-14、CEMおよびHPB-ALL)；骨髓単球細胞株(HL60)；天然キラー細胞株(YT)；大腸癌株(Colo-205およびHT29)；肺細胞株(NCI-H69およびNCI-H82)；前立腺株(PC3)；メラノーマ株(MEW0)；および乳癌細胞株(ZRT5.1、MCF7およびBT20)を含む。

【0031】

正常な血液白血球によるHB15の発現もまた調べた。しかしながら、HB15の細胞表面発現は、15例の血液サンプルの循環リンパ球、天然キラー細胞または単球では顕著なレベルでは検出されなかった。したがって、HB15は細胞活性化後に発現されるという可能性を、有糸分裂促進剤のコンカナバリンA(ConA)、アメリカヤマゴボウミトゲン、フィトヘマグルチニン-Pまたはフォルボールエステル(PMA)を用いてTリンパ球増殖を誘発することによって調べた。HB15の発現は、培養開始後2、8、12、24、48、72、120および240時間で調べた。HB15発現の出現は細胞増殖と並行していたが、最適発現は培養開始後3日目から5日目であった。また、誘発されたHB15発現量は、いずれの特定の有糸分裂促進剤とも相関していなかったが、有糸分裂シグナルの強さとより相関していた。すなわち細胞表面発現はより大型の芽細胞で専ら認められた。したがって、HB15は活性化後のリンパ球で発現した。

【0032】

HB15発現の免疫組織分析

HB15のリンパ球特異性および組織分布もまたヒトの種々の組織の免疫組織分析によって調べた。基本的には、抗HB1a単クローン性抗体を胸腺、扁桃腺、脾臓、リンパ節、腎臓、腎盂および尿管、ファロピウス管、肝臓、膵臓、胃、乳房、肺臓、食道、骨格筋、皮膚、子宮、唾液腺、甲状腺、副腎腺、心臓、虫垂、結腸を染色するために用いた。殆どの場合、HB15発現はリンパ球特異的のようで、非リンパ球組織では顕著な反応は認められなかった(図5A-5Fを参照)。扁桃腺およびリンパ節では(図5A)、HB15は小胞内領域の分散細胞(T細胞帯)によって相応に強く発現した(図5C)。これらの細胞の幾つかはリンパ芽球であったかもしれないが、それらは休止リンパ球より大型のようであり、さらにCD1表面分子を発現していたので(図5D)、殆どは有指状突起細胞(interdigitating reticulum cells)(樹状突起細胞の亜集団)であった。また、胚中心(GC；図5Aおよび5B)および小胞被膜帯(FM；図5A)内の幾つかの細胞(50-80%)はリンパ球の形態を有し、弱くHB15⁺であった。脾臓では、HB15⁺細胞は専ら白髄に限られ、一方赤髄は殆ど陰性のままであった。さらにまた、白髄中のこれら大型の分散した陽性細胞は有指状突起細胞またはリンパ芽球である可能性が高い。胸腺皮質はHB15陰性で、一方、髄質細胞の小細胞亜集団(おそらく胸腺細胞)は陽性であった(図5E)。他の非造血組織と異なり、皮膚の分析によって、ランゲルハンス細胞(樹状突起細胞の亜集団)の特徴的な分散枝状形態を有するいくつかの細胞がHB15を検出可能レベルで発現することを明らかにした。すべての非造血組織間(ここでは炎症浸潤が明瞭であった)では、少しの分散リンパ球がHB15を発現していることが認められた。循環樹状突起細胞はまたHB15⁺であるが、頻度が低いので容易には検出されない可能性が高い。同様に、樹状突起細胞の悪性対応物はまたHB15を発現する可能性が高く、ホジキン症由来の悪性細胞株で有指状突起細胞の典型である可能性が高い(Schaadtら、Int. J. Cancer, 26:723-731(1980))。L428細胞株はHB15陽性であるので、この分子は悪性細胞の診断マーカーとして用いることができる可能性がある。

【0033】

実験手順

cDNAクローンの分離

特異的なハイブリダイゼーションによるcDNAクローンの分離は既に報告された(Tedderら、Mol. Immunol. 25:1321-1330(1988))。1つのクローン、pB123を精製し、ニクトランレーションで標識し(Rigdyら、J. Mol. Biol. 113:237-251(1977))、さら

10

20

30

40

50

に報告 (Zhouら、Immunogenetics, 35:102-111(1992)) のように λ g t 1 1 (Weisら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:5639-5643(1986)) で同じヒト扁桃腺 c D N A ライブラリーをもう一度スクリーニングすることによって同種の c D N A を分離するために用いた。陽性ブランクを分離しクローニングして、さらに E c o R I によって挿入物を除去し、p S P 6 5 (Meltonら、Nucleic Acids Res., 12:7035-7056(1984)) でサブクローニングした。制限地図をマニアティスらの報告 (Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual(1982)) のように作製し、サンガーらの方法 (Sangerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467(1977)) を用いてヌクレオチド配列を決定した。

【 0 0 3 4 】

ヌクレオチドおよび蛋白配列のコンピューター検索は、蛋白同定リソースデータ (Protein Identification Resource Data (GenBank release 66 & Swiss-Prot-16)) を用いて実施した。- 1 のギャップペナルティーは、1 ギャップまたは欠失が生じた配列の各ヌクレオチドまたはアミノ酸についての配列相同性分析で調べた。

【 0 0 3 5 】

R N A プロット分析

報告 (Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual(1982)) のようにポリ (A) ⁺ R N A を分離した。ノザンプロット分析では、2 μ g のポリ (A) ⁺ R N A をグリオキサルで変性させ、1 . 1 % のアガロースゲルの電気泳動で分画し、ニトロセルロースに移した (Thomas、Methods Enzymol., 100:255(1983))。プローブとして用いた p B 1 2 3 c D N A 挿入物を分離し、ニックトランスレーション (Rigbyら、J. Mol. Biol. 113:23 7-251(1977)) を行い、報告 (Wahlら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3683-3687(1979)) のようにフィルターを用いてハイブリダイズさせた。非常に厳しい条件のハイブリダイゼーションでは、5 0 % (v / v) ホルムアルデヒド、4 $\times$ S S C、1 0 % (w / v) デキストラン硫酸ナトリウム、4 2 を用いた。フィルターは、0 . 2 $\times$ S S C、0 . 1 % S D S で 6 5 で洗浄した。R N A サイズは、標準物として同一ゲルで流した 2 8 S および 1 8 S リボソーム R N A との比較によって決定した。同じプロットをまた、身元不詳であるが全 m R N A が無傷でさらにこの発現 m R N A と同じ量であることが明らかなハウスキーピング m R N A とハイブリダイズさせた。ゆるやかな厳格度のハイブリダイゼーションの条件は、2 0 % ホルムアミド、5 $\times$ S S C (1 5 0 m M N a C l、1 5 m M クエン酸三ナトリウム)、5 0 m M 燐酸ナトリウム (p H 7 . 6)、5 $\times$ デンハルト溶液、1 0 % 硫酸デキストランおよび 2 0 μ g / m l の変性分断サケ精子 D N A を含む溶液中で一晩の反応であった。

【 0 0 3 6 】

細胞

ヒューマン・プロテクション・コミッティー・オブ・ダナファーバー・キャンサー・インスティテュート (Human Protection Committee of Dana-Farber Cancer Institute) によって承認されたプロトコルによってヒト血液を得、フィコールハイパーク濃度勾配遠心で単核球を分離した。完全培地 (1 5 % ウシ胎児血清、抗生物質およびグルタミン補充 R P M I - 1 6 4 0) 中の単核球 (1 0 ⁶ / m l) をフィットヘマグルチニン - P (2 μ g / m l、Difco、デトロイト、ミシガン)、C o n A (1 0 μ g / m l、Gibco/BRL、ベセスダ、メリーランド) またはフォーボルミリステート 1 3 - アセテート (P M A) (1 0 n g / m l、シグマ、セントルイス、ミズーリー) で、報告 (Tedderら、J. Immunol. 144:5 32-540(1990)) のように刺激した。表示時間でリンパ球を採集し、完全培地で 1 回洗浄し、下記のように直ちに免疫蛍光染色用に部分標本を採取した。

【 0 0 3 7 】

修飾 C D M 8 ベクター (Aruffoら、EMBO J. 6:3313(1987); Tedderら、J. Immunol. 143 :712-717(1989)) にサブクローニングした p H B 1 5 c D N A 挿入物で、報告されたように D E A E - デキストラン法 (Aruffoら、EMBO J. 6:3313(1987)) を用いて C O S 細胞をトランスフェクトした。細胞表面発現は、4 8 時間後に間接免疫蛍光で調べた。レトロウイルスベクター p Z i p N e o S V (X) (Cepkoら、Cell, 37:1053-1062(1984)) の B a

m H 1 部位に正確な方向性でクローニングされた p H B 1 5 c D N A を用いて、安定な c D N A トランスフェクト細胞が産生された。エレクトロポレーションによってネズミ前 - B 細胞株 (300.19) およびヒト赤白血病細胞株 (K562) をこのベクターでトランスフェクトし、その後 G 4 1 8 (Gibco/BRL) を用いて安定な核酸感染体 (トランスフェクタント) を選別した。H B 1 5 を発現している細胞を単クローン性抗体と反応させ、続いて抗マウス I g 被覆プレート上で選り分けることによって、さらに H B 1 5 発現細胞を多くした。

【 0 0 3 8 】

1 0 % ウシ胎児血清および抗生物質含有 R P M I 1 6 4 0 で細胞株を増殖させた。すべての細胞株培養を分析前日に分割し、対数増殖期にした。

【 0 0 3 9 】

m A b 製造

N S - 1 ミエローマ細胞と、H B 1 5 c D N A でトランスフェクトした C O S 細胞で繰り返し免疫した B A L B / c マウスの脾細胞とを融合させて、報告 (Tedder ら、J. Immuno l . 144:532-540(1990)) のように抗 H B 1 5 単クローン性抗体を生成した。各ハイブリドーマを 2 回クローニングし、腹水液を生成するために用いた。m A b のアイソタイプはアマーシャム社 (アーリントンハイツ、イリノイ) 製マウス単クローン性抗体アイソタイプングキットを用いて決定した。

【 0 0 4 0 】

免疫蛍光分析

細胞を 4 に保ち分離後直ちに調べた。生細胞の間接免疫蛍光分析を細胞を 3 回洗浄した後実施した。続いて細胞を免疫染色用の至適濃度に希釈した腹水液としての各 m A b とともに氷上で 2 0 分保温した。ヒト白血球と反応しないアイソタイプ適合ネズミ抗体を陰性コントロールとして用いた。洗浄後、フルオレセインイソチオシアネート結合ヤギ抗マウス I g 抗体 (Southern Biotechnology Associates、バーミンガム、アラバマ) で、細胞を 4 2 0 分処理した。エピックスプロファイル (Epics Profile) フローサイトメトリー (コールターエレクトリクス、ハイアレー、フロリダ) によって単色免疫蛍光分析を実施した。各サンプルに付き 1 万個の細胞を調べた。

【 0 0 4 1 】

免疫沈降分析

細胞を 2 回洗浄し、食塩水に再浮遊させ、報告のように (Thompson ら、Biochem. , 26:7 43-750(1987)) ヨードゲン (iodogen) 法によって標識した。洗浄後、1 % (v / v) トリトン X - 1 0 0 およびプロテアーゼインヒビター含有緩衝液 1 m l 中で記載 (Tedder ら、P roc . Natl . Acad . Sci . USA , 85:208(1988)) の通り細胞を溶解した。製造元の支持に従い、直接アフィゲル (Affigel) (バイオラッド、リッチモンド、バージニア) にゲル 1 m l につき 2 m g の m A b の割合で直接結合させた抗 H B 1 5 a 単クローン性抗体またはマウス I g (陰性コントロールとして) を用いて、免疫沈降を実施した。細胞溶解物は、5 0 μ l (5 0 % v / v) のネズミ I g 被覆ビーズを用いて 4 で 2 時間 2 回予備沈降させた。細胞溶解物はさらに一晚予備沈降させた。その後、予備沈降させた溶解物の半分を 2 5 μ l の抗 H B 1 5 a 単クローン性抗体被覆ビーズまたはネズミ I g 被覆ビーズとともに 4 1 8 時間一定の攪拌で保温した。免疫沈降物を洗浄し、記載 (Tedder ら、P roc . Natl . Acad . Sci . USA , 85:208(1988)) の通り S D S - P A G E (サンプルの半分は 5 % の 2 - メルカプトエタノールの存在下 (還元状態)) で分析した。M r は予め染色された標準分子量マーカー (Gibco/BRL) を用いて決定した。

【 0 0 4 2 】

免疫組織化学

コーデルラ (Cordell ら、J. Histochem. Cytochem. 31:219-229(1984)) の記載のように修飾 A P A A P 法を用いて、全組織を染色した。基本的には、スライドをまず単クローン性抗体で保温し、続いてウサギ抗マウス (架橋) 抗体による保温工程を行った。その後、アルカリホスファターゼで予備保温した、アルカリホスファターゼに対する単クローン性抗体で処理した。この方法の感度を高めるために、表面のホスファターゼ分子の数を 1

10

20

30

40

50

層または2層の架橋抗体および抗ホスファターゼ抗体を用いることによって増加させた。結合ホスファターゼ分子を基質として新フクシンを用いて可視化した (Cordellら、J. Histochem. Cytochem. 31:219-229(1984))。

【0043】

用途

H B 1 5 蛋白もしくはその免疫特異的フラグメント、またはその抗体もしくはH B 1 5 機能に対する他の拮抗物質は、種々の免疫疾患、疾病または症候群の診断または治療に用いることができる。そのような目的のために、可溶性外部ドメインがしばしば用いられるであろう。これは典型的には (しかし必ずしも必然的ではないが)、例えばデキストランもしくはポリアミノ酸担体またはH B 1 5 フラグメント融合蛋白および担体分子を用いて多価状態で重合化されているであろう。また別にリポゾームを治療用賦形剤として用いることができ、その場合には、トランスメンブレンドメインおよび、好ましくは細胞質ドメインの少なくとも幾らかがまた含まれるであろう。例えば、ランゲルハン氏細胞は、皮膚の第一次免疫応答細胞で、T細胞に抗原を提示し、接触過敏を誘導する役割を果たすので、さらに、H B 1 5 はランゲルハン氏細胞によって発現され、抗原提示に関与するので、ヒトの皮膚疾患、例えば乾癬、自己免疫疾患。臓器移植およびエイズの病理発生に関与する可能性が高い。

10

【0044】

したがって、H B 1 5 機能の拮抗物質は、これら疾患の治療について重要な治療剤を提供することができる。同様に、H B 1 5 はリンパ球活性化のための付随分子として機能する可能性があるので、H B 1 5 抗原、そのフラグメントまたはドメインは、免疫反応を増大させる作用薬として用いることができる。

20

【0045】

より具体的には、樹状突起細胞はヒト免疫不全ウイルス (エイズの原因微生物) の一次標的である。インビボではエイズウイルスの80%は樹状突起細胞、特にランゲルハン氏細胞、循環樹状突起細胞および有指状突起細胞網細胞によって産生されることが最近提唱された (Langhofferら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7998-8002(1991))。また、殆どの感染は粘膜表面を介して生じるが、その場合、樹状突起細胞がまず感染すると考えられる。したがって、本試薬は、エイズまたはエイズ関連疾患の有望な予防または治療のための重要な手段を提供する。

30

【0046】

一定の病的状態のモニターのために、患者の血液血清中の内因性可溶性H B 1 5 量を定量することが推奨できるであろう。正常状態または病的な状態でいくつかのレセプターが放出されることが知られていることに基づいて、H B 1 5 もまた細胞表面から酵素的過程によって失われるという可能性がある。また、定量的な検出は、白血球の活性化もしくは白血球機能の変化の診断および / または検出のために、H B 1 5 の異常発現または発現低下について白血球を識別する方法において有用であろう。さらに、組換え体治療剤の製造中に産生されるレセプターまたはそのフラグメントの量を定量する能力も利点であろう。H B 1 5 レベルの定量は当業者に既知の多数の分析方法を用いて実施できるが、これらの方法は、H B 1 5 に対して作製した単クローン性抗体を用いる酵素結合免疫検定を含む。

40

【0047】

同様に、一定の臨床状態の治療では、内因性可溶性H B 1 5 またはH B 1 5⁺細胞を患者の血液から除去することが推奨されるであろう。これは、開示したH B 1 5 の外部ドメインに対して作製された抗体または他の結合剤を含む免疫選別カラムを用いることによって、現存のオンラインおよびオフライン技術を用いて実施できる。

【0048】

現時点では、ヒトの非小胞性樹状突起細胞のための特異的なマーカーは存在しない。H B 1 5 単クローン性抗体をH B 1 5⁺細胞の識別のために使用することによって、この蛋白を発現している細胞を非関連細胞集団から分離および精製することが可能になった。

【0049】

50

H B 1 5 単クローン性抗体は、有指状突起細胞肉腫またはこの抗原を発現する他の悪性細胞型の評価および診断にもまた有用であろう。したがって、H B 1 5 基剤薬は免疫治療または免疫画像化について適切であろう。

【 0 0 5 0 】

さらに、H B 1 5 機能の分析は、このレセプターの生理学的役割におけるさらに進んだ研究で用いることができる。例えば、予備実験では、混合リンパ球反応におけるT細胞増殖（T細胞活性化検定）は、抗H B 1 5 単クローン性抗体の存在によって部分的に抑制される。この機能分析は、T細胞機能の開始における樹状突起細胞または単球のH B 1 5 分子の役割を提示する。

【 0 0 5 1 】

これまで本発明を好ましい実施例と合わせて記載したが、前述の記載の読後、当業者は種々の変更、同等物の置き換え、並びに前述の組成および方法に対するその他の変更を実施することができるであろう。したがって、本発明に対するレターズパテントによって付与される保護は、添付の請求の範囲およびその同等物に含まれる範囲によってのみ制限されるであろう。

【 0 0 5 2 】

寄託

以下のハイブリドーマは1992年3月17日にアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC）に寄託された。

性状	ATCC 番号
抗H B 1 5 a ハイブリドーマ細胞株、H B 1 5 a	H B 1 0 9 8 7
抗H B 1 5 b ハイブリドーマ細胞株、H B 1 5 b	H B 1 0 9 8 8

【 0 0 5 3 】

出願人の譲受人、Dana - Farber Cancer Institute, Inc., はATCCが該寄託の永久に保存できる寄託所であり、特許が付与された場合、公衆がそれを容易に入手できることを明言する。このように寄託した物質の公衆の入手に関する全ての制限は、特許付与の際に完全に取り除かれる。特許出願中に、37CFR1.14および35USC122の下にそれに対して権利を有すると長官が認めた者は、該物質を入手することができる。該寄託物質は、そのサンプルの最も最近の供給の要請後少なくとも5年間、さらにいずれの場合においても寄託の日から少なくとも30年間または特許の有効期間の間（いずれか期間の長い方）は、活力を保持し、かつ汚染されないよう必要な全ての注意をもって維持されるであろう。出願人の譲り受け人は、該寄託所が、要請時に該寄託物の条件のためにサンプルを供給できない場合は、該寄託物を置き換える義務を負うことを承認する。

【 0 0 5 4 】

[配列表]

10

20

30

配列リスト

(1) 一般情報:

(i) 出願人: Dana-Farber Cancer Institute, Inc.

(ii) 発明の名称: リンパ球活性化抗原: 免疫グロブリン上科の一種

(iii) 配列の総数: 2

(iv) 郵便物の宛先:

10

(A) 名宛人: Weingarten, Schurgin, Gagnebin & Hayes

(B) 丁名: Ten Post Office Square

(C) 町名: ボストン

(D) 州名: メリーランド

(E) 国名: アメリカ合衆国

(F) ジップコード: 02109

20

(v) コンピューター解読形式

(A) 媒体型: フロッピーディスク

(B) コンピューター: IBMPCコンパチブル

(C) 演算システム: PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフト: PatentIn Release #1.0, バージョン #1.25

(vi) 現在の出願状況:

30

(A) 出願番号:

(B) 出願日:

(C) 分類:

(vii) 先行出願状況:

(A) 出願番号: US07/870029

(B) 出願日: 1992年4月17日

40

(viii) 代理人情報:

(A) 氏名: Holliday C Heine

(B) 登録番号: 34346

(C) リファレンス/ドケット番号: DFCI-230Xq999

(ix) 通信に関する情報:

(A) 電話：(617) 542-2290

(B) ファクシミリ：(617) 451-0313

(C) テレックス：940675

(2) 配列番号：1の情報：

(i) 配列の性状：

(A) 長さ：1762塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の種類：二本鎖

(D) トポロジー：直線状

(ii) 分子の種類：cDNA

(iii) 仮の配列：否

(iv) アンチセンス：否

(ix) 特徴：

(A) 名称／キー：CDS

(B) 所在場所：11..625

(ix) 特徴：

(A) 名称／キー：mat peptide

(B) 所在場所：68..622

(xi) 実際の配列：配列番号：1：

GAATTCGCC ATG TCG CGC GGC CTC CAG CTT CTG CTC CTG AGC TGC GCC	49
Met Ser Arg Gly Leu Gln Leu Leu Leu Leu Ser Cys Ala	
-19 -15 -10	
TAC AGC CTG GCT CCC GCG ACG CCG GAG GTG AAG GTG GCT TGC TCC GAA	97
Tyr Ser Leu Ala Pro Ala Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu	
-5 1 5 10	
GAT GTG GAC TTG CCC TGC ACC GCC CCC TGG GAT CCG CAG GTT CCC TAC	145
Asp Val Asp Leu Pro Cys Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr	
15 20 25	
ACG GTC TCC TGG GTC AAG TTA TTG GAG GGT GGT GAA GAG AGG ATG GAG	193
Thr Val Ser Trp Val Lys Leu Leu Glu Gly Gly Glu Glu Arg Met Glu	
30 35 40	
ACA CCC CAG GAA GAC CAC CTC AGG GGA CAG CAC TAT CAT CAG AAG GGG	241
Thr Pro Gln Glu Asp His Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly	
45 50 55	
CAA AAT GGT TCT TTC GAC GCC CCC AAT GAA AGG CCC TAT TCC CTG AAG	289
Gln Asn Gly Ser Phe Asp Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys	
60 65 70	

10

20

30

40

ATC CGA AAC ACT ACC AGC TGC AAC TCG GGG ACA TAC AGG TGC ACT CTG Ile Arg Asn Thr Thr Ser Cys Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu 75 80 85 90	337	
CAG GAC CCG GAT GGG CAG AGA AAC CTA AGT GGC AAG GTG ATC TTG AGA Gln Asp Pro Asp Gly Gln Arg Asn Leu Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg 95 100 105	385	
GTG ACA GGA TGC CCT GCA CAG CGT AAA GAA GAG ACT TTT AAG AAA TAC Val Thr Gly Cys Pro Ala Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Tyr 110 115 120	433	
AGA GCG GAG ATT GTC CTG CTG CTG GCT CTG GTT ATT TTC TAC TTA ACA Arg Ala Glu Ile Val Leu Leu Ala Leu Val Ile Phe Tyr Leu Thr 125 130 135	481	10
CTC ATC ATT TTC ACT TGT AAG TTT GCA CGG CTA CAG AGT ATC TTC CCA Leu Ile Ile Phe Thr Cys Lys Phe Ala Arg Leu Gln Ser Ile Phe Pro 140 145 150	529	
GAT TTT TCT AAA GCT GGC ATG GAA CGA GCT TTT CTC CCA GTT ACC TCC Asp Phe Ser Lys Ala Gly Met Glu Arg Ala Phe Leu Pro Val Thr Ser 155 160 165 170	577	
CCA AAT AAG CAT TTA GGG CTA GTG ACT CCT CAC AAG ACA GAA CTG GTA Pro Asn Lys His Leu Gly Leu Val Thr Pro His Lys Thr Glu Leu Val 175 180 185	625	
10		
TGAGCAGGAT TTCTGCAGGT TCTTCTTCCT GAAGCTGAGG CTCAGGGGTG TGCCTGTCTG	685	
TTACACTGGA GGAGAGAAGA ATGAGCCTAC GCTGAAGATG GCATCCTGTG AAGTCCTTCA	745	
CCTCACTGAA AACATCTGGA AGGGGATCCC ACCCCATTTT CTGTGGGCAG GCCTCGAAAA	805	
CCATCACATG ACCACATAGC ATGAGGCCAC TGCTGCTTCT CCATGGCCAC CTTTTCAGCG	865	
ATGTATGCAG CTATCTGGTC AACCTCCTGG ACATTTTTTTC AGTCATATAA AAGCTATGGT	925	
GAGATGCAGC TGGAAAAGGG TCTTGGGAAA TATGAATGCC CCCAGCTGGC CCGTGACAGA	985	
CTCCTGAGGA CAGCTGTCCT CTTCTGCATC TTGGGGACAT CTCTTTGAAT TTTCTGTGTT	1045	
TTGCTGTACC AGCCCAGATG TTTTACGTCT GGGAGAAATT GACAGATCAA GCTGTGAGAC	1105	30
AGTGGGAAAT ATTTAGCAAA TAATTCCTG GTGTGAAGGT CCTGCTATTA CTAAGGAGTA	1165	
ATCTGTGTAC AAAGAAATAA CAAGTCGATG AACTATTCCC CAGCAGGGTC TTTTCATCTG	1225	
GGAAAGACAT CCATAAAGAA GCAATAAAGA AGAGTGCCAC ATTTATTTTT ATATCTATAT	1285	
GTACTIONGTCA AAGAAGGTTT GTGTTTTTCT GCTTTTGAAA TCTGTATCTG TAGTGAGATA	1345	
GCATTGTGAA CTGACAGGCA GCCTGGACAT AGAGAGGGAG AAGAAGTCAG AGAGGGTGAC	1405	
AAGATAGAGA GCTATTTAAT GGCCGGCTGG AAATGCTGGG CTGACGGTGC AGTCTGGGTG	1465	
CTCGTCCACT TGTCCCACTA TCTGGGTGCA TGATCTTGAG CAAGTTCOTT CTGGTGTCTG	1525	40
CTTTCTCCAT TGTAACCAC AAGGCTGTTG CATGGGCTAA TGAAGATCAT ATACGTGAAA	1585	
ATTCTTTGAA AACATATAAA GCACTATACA GATTCGAAAC TCCATTGAGT CATTATCCTT	1645	
GCTATGATGA TGGTGTTTTG GGGATGAGAG GGTGCTATCC ATTTCTCATG TTTTCCATTG	1705	
TTTGAAACAA AGAAGGTTAC CAAGAAGCCT TTCCTGTAGC CTTCTGTAGG AATTCCA	1762	

(2) 配列番号：2の情報：

(i) 配列の性状：

(A) 長さ：205アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) トポロジー：直線状

(ii) 分子の種類：蛋白

10

(xi) 実際の配列：配列番号：2：

```

Met Ser Arg Gly Leu Gln Leu Leu Leu Leu Ser Cys Ala Tyr Ser Leu
-19          -15          -10          -5

Ala Pro Ala Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp
          1          5          10

Leu Pro Cys Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser
          15          20          25

Trp Val Lys Leu Leu Glu Gly Gly Glu Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln
30          35          40          45

Glu Asp His Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly
          50          55          60

Ser Phe Asp Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn
          65          70          75

Thr Thr Ser Cys Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp Pro
          80          85          90

Asp Gly Gln Arg Asn Leu Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg Val Thr Gly
          95          100          105

Cys Pro Ala Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu
110          115          120          125

Ile Val Leu Leu Leu Ala Leu Val Ile Phe Tyr Leu Thr Leu Ile Ile
          130          135          140

Phe Thr Cys Lys Phe Ala Arg Leu Gln Ser Ile Phe Pro Asp Phe Ser
          145          150          155

Lys Ala Gly Met Glu Arg Ala Phe Leu Pro Val Thr Ser Pro Asn Lys
          160          165          170

His Leu Gly Leu Val Thr Pro His Lys Thr Glu Leu Val
          175          180          185

```

20

30

40

【図面の簡単な説明】

【0055】

【図1】HB15 cDNA クローンの構造および制限部位の位置を示す図。

【図2A】HB15のcDNAヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を示す図。

【図2B】HB15のcDNAヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を示す別の図。

【図3】HB15の細胞外ドメインの構造の仮説モデルを示す図。

【図4A】HB15を発現している3つの類リンパ芽球細胞株で得られた免疫蛍光の結果を示す図。

【図4B】HB15を発現している3つの類リンパ芽球細胞株で得られた免疫蛍光の結果 50

【図 5 A】HB 15 発現の免疫組織化学分析を示す図。

【図 5 B】HB 15 発現の免疫組織化学分析を示す別の図。

【図 5 C】HB 15 発現の免疫組織化学分析を示す別の図。

【図 5 D】HB 15 発現の免疫組織化学分析を示す別の図。

【図 5 E】HB 15 発現の免疫組織化学分析を示す別の図。

【図 5 F】 H B 1 5 発現の免疫組織化学分析を示す別の図。

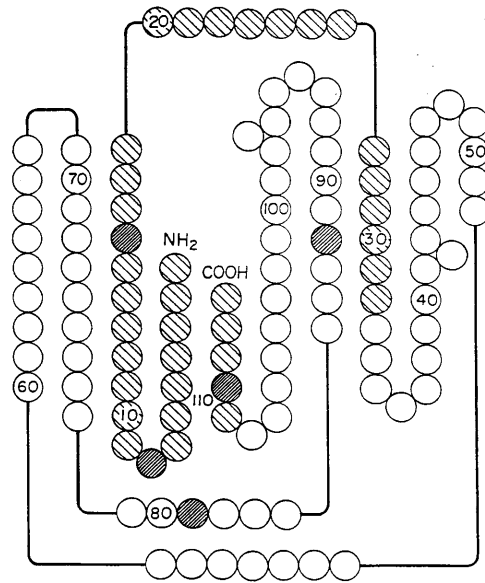
[illegible]

【 図 2 B 】

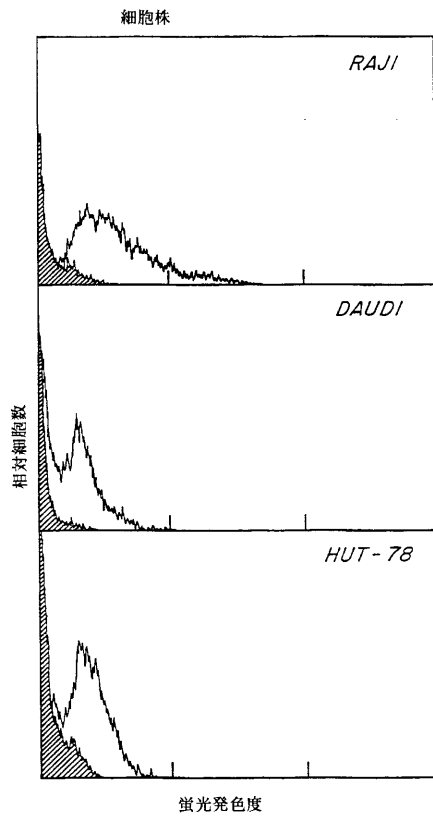
668
 738
 808
 878
 948
 1018
 1088
 1158
 1228
 1298
 1368
 1438
 1508
 1578
 1648
 1718
 1761

T P H K T E L V *
 ACT CCT CAC AAG ACA GAA CTG GTA TGA GCAGGATTTC TGAGGTCTT TCTCTCTGAA GCTGAGGCTC
 AGGGGTGCG CTGTCTGTGA CACTGGAGGA GAGAGAAATG AGCTTCCGT GAGATGGCA TCCTGTGAG
 TCCTTCACT CACTGAAAC ATCTGGAAGG GATCCCAACC CCATTTCTG TGGGAGGCC TCGAAACCA
 TCACATGACC ACATGACATG AGGCCACTGC TCTTCTTCCA TGGCCACTT TTGAGGCTG TAAGCAGCTA
 TCTGTTCAC CTCTGGACA TTTTTCAGT CATATAAAG CTAATGTGAG ATGAGCTGAG AAAGGCTCT
 TGGGAATAT GAATGCCCC AGCTGGCCG TGACAGACTC CTGAGGACG CTGCTCTCTT CTGCACTTG
 GGGACATCT TTGAAATTT CGTGTCTTT CTGACCAGC CCAGATGTTT TACGTCTGG AGAATTTGAC
 AGATCAAGT GTGACAGT GGGAAATTT TAGCAATAA TTTCTTGGTG TGAGGCTCTT GCTATTACTA
 AGGAGTAATC TGGTACANA GAATACAA GTCCACAT TATTTTATA TCTATATGTA CTGTCTGGA
 AAGATTGTC TTTTCTGCT TTGAAACT GTACTCTAG TGAGATGCA TTGTGAATG ACAGGAGGCC
 TGGACATAGA GAGGGAGAG AGTCAAGCA GGTGACAG ATAGAGCT ATTTAATGC CGGTGAGAA
 GTCTGGGCTG ACGTGTGCTT TCTCCATGT AAACCAAG CGGTGCTG CCACTACTT GGTGCTGCA TCTTGGCAA
 CTTGAAATTT CTTTTGAAC ATATANGCA TCGAACTCC AGGTGCTG ATGAGTATG TATCTTGGT
 ATGATGATGG TGTTTTGGG ATGAGAGGT GCTATCCAT TCTCAGTTT TCCATGTTT GAACAAAGA
 AGGTTACCA GAAGCCTTTC CTGTAGCCTT

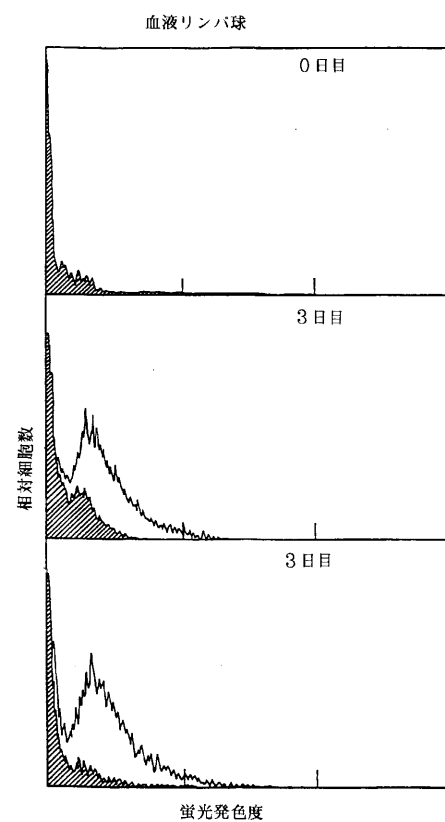
【 図 3 】



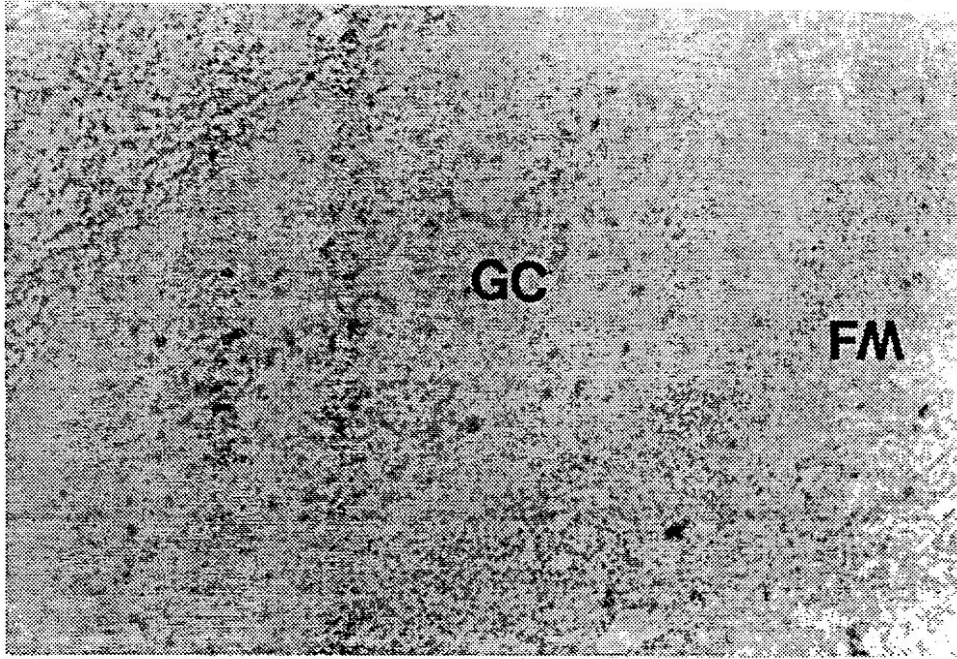
【 図 4 A 】



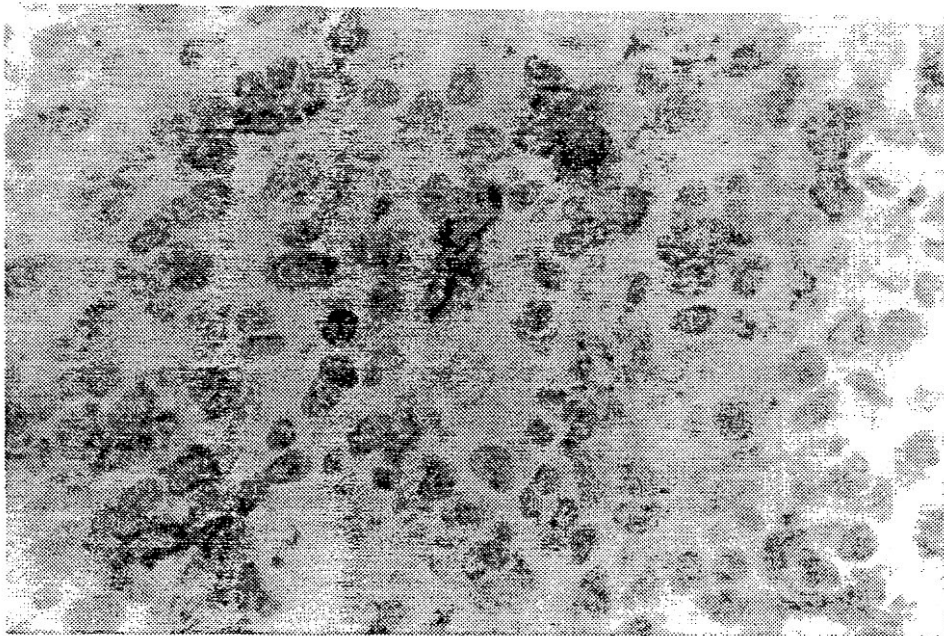
【 図 4 B 】



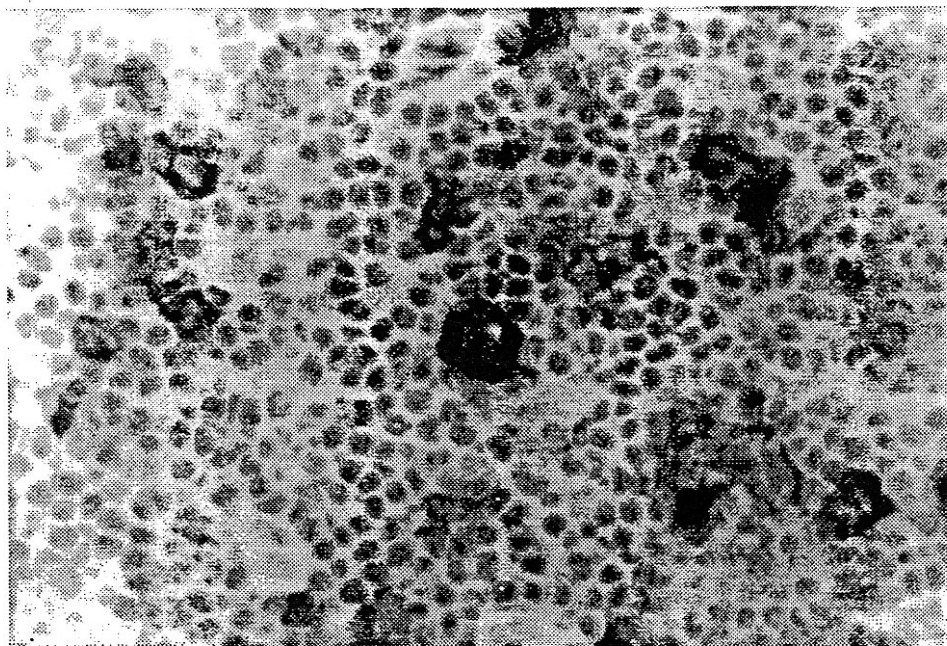
【図 5 A】



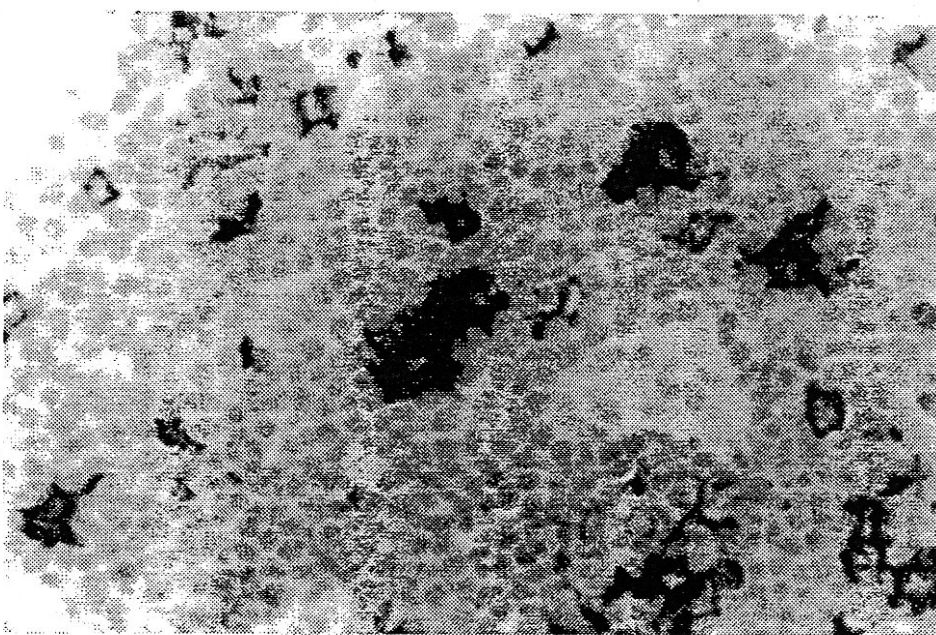
【図 5 B】



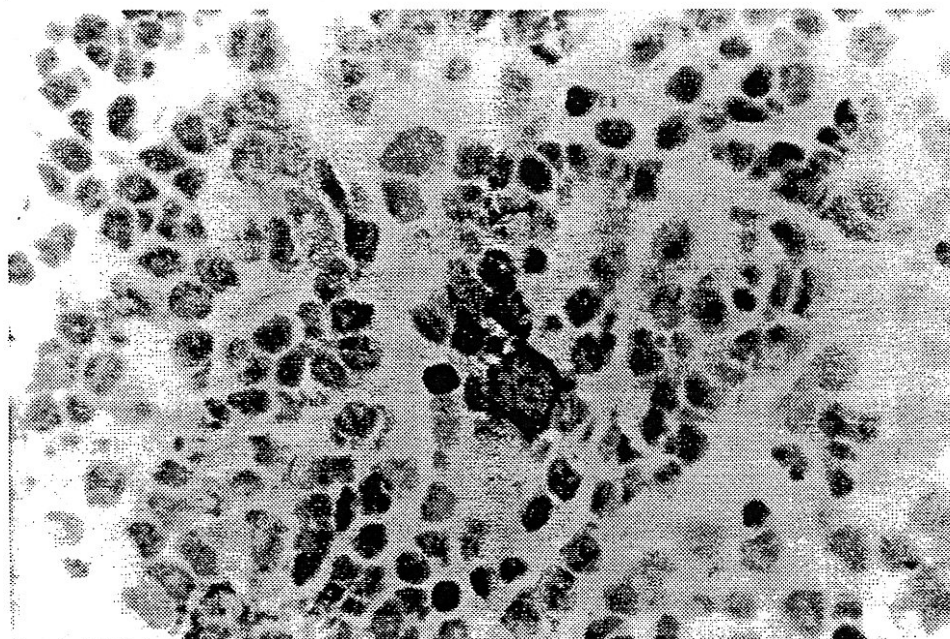
【図 5 C】



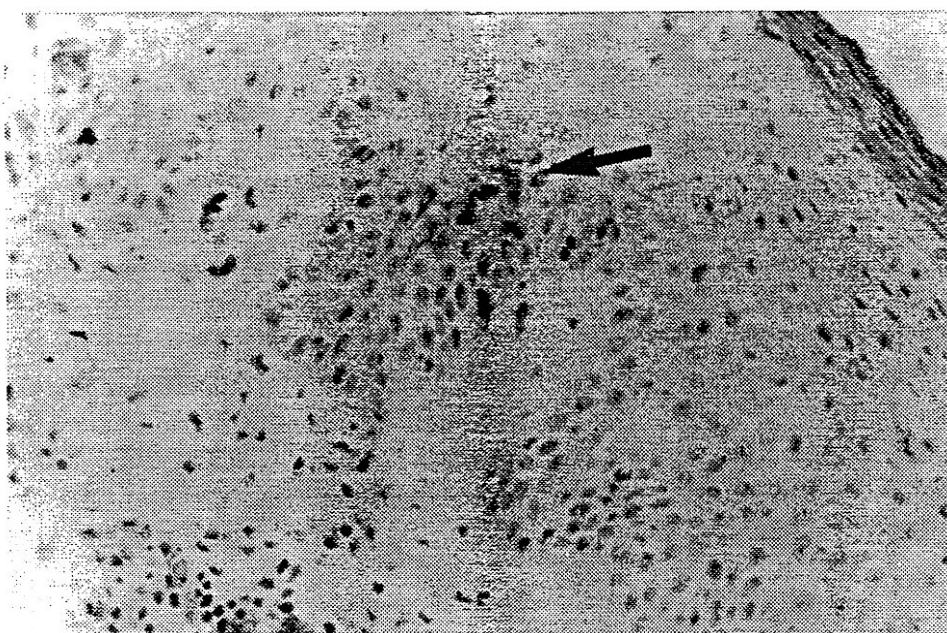
【図 5 D】



【図 5 E】



【図 5 F】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21		4 C 0 8 5	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	A	4 H 0 4 5	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C		
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A		
C 1 2 N	15/02	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	C		
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	B		
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P	37/02			
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/18			
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	37/02			
			A 6 1 K	39/395	S		

(72)発明者 ゾー , リアング - ジ

アメリカ合衆国 0 2 1 1 5 マサチューセッツ州 ボストン エイピーティー . 1 8 リバーウ
エイ 3 6 0

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 CA04 CA09 DA02 EA04 HA12 HA14 HA15
4B063 QA01 QA19 QQ52 QR55 QS34
4B064 AG01 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA90X AA92X AA94Y AB01 AB04 AC14
BA02 BA03 BA08 CA24 CA25 CA44 CA46
4C084 AA07 DC50 NA14 ZB07 ZC552
4C085 AA14 BB11 CC02
4H045 AA11 AA20 BA10 CA40 DA75 DA76 DA86 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	淋巴细胞活化抗原hb15：免疫球蛋白超家族成员		
公开(公告)号	JP2007159580A	公开(公告)日	2007-06-28
申请号	JP2006330466	申请日	2006-12-07
[标]申请(专利权)人(译)	达那-法伯癌症研究所		
申请(专利权)人(译)	达纳 - 法伯癌症酒店硬脂Teyuto公司		
[标]发明人	テダー トーマス エフ ゾー リアング ジ		
发明人	テダー, トーマス, エフ. ゾー, リアング-ジ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/47 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 C12Q1/68 C12N15/02 A61P37/02 A61P31/18 A61K38/00 A61K39/395 G01N33/53 A61K51/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P43/00 C07H21/04 C07K14/705 C12N15/12 C12N15/13 C12P21/08 C12R1/91 G01N33/566		
CPC分类号	C07K16/2803 A61K38/00 C07K14/70503		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/47 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12P21/02.C C12Q1/68.A C12N15/00.C C12N5/00.B A61P37/02 A61P31/18 A61K37/02 A61K39/395.S A61K38/00 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/00.102 C12N5/16		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/HA12 4B024/HA14 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ52 4B063/QR55 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA90X 4B065/AA92X 4B065/AA94Y 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA03 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA07 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZB07 4C084/ZC552 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC02 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	秋本照雄		
优先权	07/870029 1992-04-17 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种由活化淋巴细胞表达的新型细胞表面糖蛋白（称为HB15）。公开了淋巴细胞活化抗原HB15，人cDNA和编码HB15的基因序列。HB15不能通过可检测水平的循环白细胞表达，但是在组织之间具有独特的表达模式。HB15仅由朗格罕细胞和皮肤中其他树突状细胞亚群表达。还公开了使用与HB15反应的抗体和抗HB15抗体或其他HB15拮抗剂的方法来治疗免疫疾病、疾病或综合症。[选型图]图1

